

Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) **EP 1 031 830 A1**

(12) **DEMANDE DE BREVET EUROPEEN**

(43) Date de publication:
30.08.2000 Bulletin 2000/35

(51) Int Cl.7: **G01N 27/327, C12Q 1/00,
C12Q 1/56**

(21) Numéro de dépôt: 99103418.2

(22) Date de dépôt: 23.02.1999

(84) Etats contractants désignés:
**AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE**
Etats d'extension désignés:
AL LT LV MK RO SI

(71) Demandeur: **ASULAB S.A.**
CH-2501 Bienne (CH)

(72) Inventeurs:
• **Frenkel, Erik Jan**
2009 Neuchâtel (CH)

• **Haeberli, André**
3073 Gümligen (CH)
• **Moresi, Anita**
3008 Bern (CH)

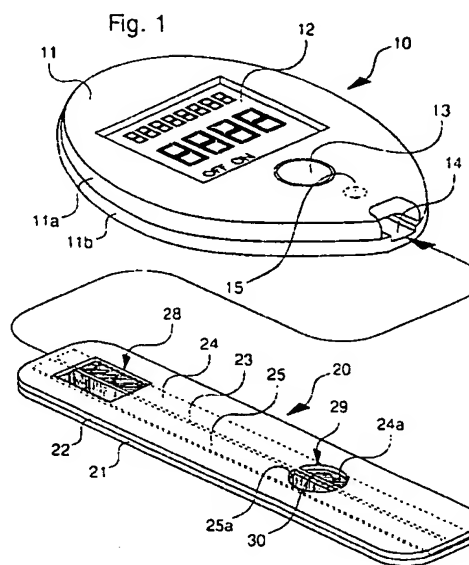
(74) Mandataire: **Thérond, Gérard Raymond et al**
I C B
Ingénieurs Conseils en Brevets SA
Rue des Sors 7
2074 Marin (CH)

(54) **Système électrochimique pour la détermination d'un temps de coagulation du sang**

(57) Système de mesure électrochimique d'une valeur représentative d'un temps de coagulation d'une goutte de sang entier, comprenant :

- un capteur électrochimique en forme de languette de petites dimensions supportant au moins une électrode référence et une électrode de travail sur laquelle est immobilisé un réactif spécifique comprenant incorpore au moins un substrat chimique dont un maillon terminal peut être coupé par la thrombine pour donner des groupes chargés (LG), et
- un appareil de mesure électronique destiné à recevoir ledit capteur permettant d'imposer entre les électrodes une tension un courant donné, de traiter le signal résultant de la migration des groupes chargés, de le corrélérer avec une valeur représentative du temps de coagulation et d'afficher ladite valeur sur un écran.

Le réactif spécifique comprend de préférence un dérivé oligopeptidique comme substrat, une trombo-plastine et un milieu tampon.



EP 1 031 830 A1

Description

[0001] La présente invention a pour objet un système individuel de détermination du temps de coagulation du sang entier, un capteur jetable de petites dimensions comportant un réactif spécifique de l'enzyme thrombine pour permettre une détermination électrochimique et un appareil de mesure électronique permettant de corréliser un signal électrique reçu dudit capteur lorsqu'il a été introduit dans l'appareil et qu'une goutte de sang à analyser a été déposée sur celui-ci.

[0002] L'invention concerne plus particulièrement un tel appareil de mesure et un capteur permettant de déterminer par ampérométrie le temps de prothrombine (PT) lorsque la composition du réactif déposé sur le capteur comprend un substrat chimique dont une fraction terminale peut être sélectivement coupée par l'enzyme thrombine en libérant un groupe chargé.

[0003] Le contrôle du temps de coagulation du sang, c'est-à-dire l'aptitude des composants du sang à former un caillot pour prévenir un risque hémorragique, fait partie des examens de routine, voire d'examens journaliers, dans de nombreuses situations pathologiques acquises, traumatiques ou postopératoires. Il est par exemple nécessaire lors d'un traitement par anticoagulants dans le cas de maladies cardiaques de pouvoir ajuster précisément la posologie du médicament, par exemple la warfarin ou l'héparine, afin d'éviter les risques hémorragiques en cas de surdosage ou au contraire les risques de thrombose si la quantité d'anticoagulants administrée est insuffisante.

[0004] Différents paramètres ont été retenus pour effectuer cette détermination, mais le plus usuel est la mesure du temps de prothrombine (PT) après activation, c'est-à-dire le temps au bout duquel on observe la formation d'un caillot avec un échantillon de sang prélevé sur un patient. De telles analyses ont longtemps relevé de la seule compétence d'un personnel spécialisé de laboratoire équipé d'appareils complexes et encombrants. Cela avait l'inconvénient d'obliger le patient à se déplacer, de nécessiter une préparation d'un échantillon de sang prélevé à domicile, par exemple par adjonction de citrate, pour attendre le moment de pouvoir effectuer une analyse en laboratoire.

[0005] Les progrès réalisés au niveau de la miniaturisation, notamment par l'emploi de composants électroniques, ont permis depuis un peu plus d'une dizaine d'années de procurer à un patient divers types d'appareils moins encombrants qui lui permettent d'effectuer chez lui une mesure du temps de coagulation. Dans leur majorité ces appareils individuels font appel aux mêmes principes que les appareils de laboratoire, à savoir l'observation directe de la dynamique des érythrocytes dans un échantillon de sang, auquel ont été ajoutés des réactifs usuels de coagulation, lorsqu'il passe d'un état fluide à un état visqueux ou figé.

[0006] Selon un premier principe, on mesure le temps au bout duquel un échantillon de sang préparé ne s'écoule plus à travers un tube capillaire, ou à travers l'étranglement calibré d'un tube de plus grand diamètre, supporté par un moyen récepteur à usage unique adaptable à un appareil de mesure. Cet écoulement est généralement forcé au moyen d'un dispositif de pompage pneumatique intégré dans l'appareil de mesure, et la détection du temps au bout duquel se produit la coagulation est généralement détectée par des moyens optiques. Des dispositifs de ce type sont par exemple décrits dans les documents US 3,486,859, US 3,890,098 et US 5,302,348. Un appareil reposant sur ce principe est par exemple celui proposé sous la marque "Hemochron", ou selon une variante plus récente sous la marque "Protime Microcoagulation System" par International Technidyne Corporation (NJ - USA). L'appareil de mesure comporte évidemment une source d'énergie pour alimenter à la fois la partie mécanique (pompe) et le contrôle de fin de coagulation (détection optique). On observera en outre que chaque moyen récepteur de l'échantillon de sang à analyser, jetable après le premier usage est relativement encombrant (environ 3 x 9 cm) et relève d'une technologie de précision (calibration du tube capillaire ou de l'étranglement) qui contribue nécessairement à élever le coût de chaque analyse effectuée.

[0007] Selon un deuxième principe, on mesure le temps au bout duquel un échantillon de sang préparé, et déposé dans un coupelle jetable permet par coagulation d'immobiliser un objet magnétique mis en mouvement par un champ magnétique tournant, la détection du phénomène de coagulation étant là encore le plus souvent effectuée par des moyens optiques. Le document US 3,967,934 décrit déjà ce principe dans lequel le container destiné à recevoir l'échantillon contient une bille ferromagnétique. Un tel dispositif est par exemple utilisé dans l'appareil diffusé par Nycomed Pharma (Oslo Norvège) sous la marque "Trombotrack". Selon une autre variante, décrite par exemple dans le document US 5,154,082, la bille est remplacée par des particules ferromagnétiques, également soumises à un champ électromagnétique. Cela a permis de réaliser un réactif sous forme sèche, déposée sur un support, la mobilité des érythrocytes étant toujours détectée par des moyens optiques. Un dispositif du type précédent correspond par exemple à un appareil de Boehringer Mannheim (Allemagne) vendu sous la marque Coaguchek. Les produits proposés correspondant à ce deuxième principe présentent les mêmes inconvénients que ceux déjà mentionnés pour les appareils selon le premier principe à l'exception peut-être du coût moindre des moyens récepteurs de l'échantillon de sang pour l'appareil Coaguchek.

[0008] Des tests comparatifs effectués avec les méthodes et dispositifs de l'art antérieur précité ("Home Prothrombin Estimation" Angelida Bernardo et al., Thrombosis, Embolism and Bleeding, ch. 3.5 - E. G. Butchart et E. Bodnar ICR Publishers 1992) ont montré que le suivi médical d'un patient à domicile était au moins aussi satisfaisant que celui d'un patient en milieu hospitalier, mais que des résultats fiables et reproductibles ne pouvaient être obtenus qui si le

patient avait suivi un apprentissage plus ou moins long. Les appareils de cet art antérieur sont évidemment prévus pour un usage domestique, sont facilement déplaçables mais restent encore relativement trop volumineux pour qu'un patient puisse le garder à demeure sur lui, par exemple dans une poche de vêtement, lors de ses déplacements. Il est sans doute également souhaitable, pour la fiabilité de mesures qui dépendent de dispositifs à la fois optiques et électromécaniques, que lesdits appareils subissent le moins de déplacements possible.

[0009] On observera enfin que, selon l'un ou l'autre des principes ci-dessus, la source d'énergie électrique nécessaire pour alimenter les dispositifs optiques et électromécaniques doit être relativement importante lorsqu'elle est autonome (pile ou batterie) mais qu'elle n'intervient jamais directement dans la mesure du temps de coagulation.

[0010] On peut toutefois signaler un brevet US 3,674,012 de 1972 qui décrit une seringue dont la paroi interne comporte une succession d'électrodes permettant de mesurer la variation d'impédance du milieu, au moyen d'un oscilloscope connecté à ladite seringue, au fur et à mesure que le phénomène de coagulation progresse. Un tel dispositif ne repose encore que sur la variation des propriétés du milieu en cours de coagulation et n'est manifestement pas destiné à un usage individuel.

[0011] Le dispositif décrit dans le document EP 0 679 193, permettant entre autre de déterminer le temps de prothrombine, comporte deux électrodes qui n'interviennent dans ladite détermination que pour détecter, à partir d'un signal représentatif de la variation de résistance entre les électrodes, la présence d'un échantillon de sang sur le moyen récepteur, et n'ont aucun rôle direct pour mesurer une durée. Dans ce dispositif la mesure de la durée est effectuée par une détermination photométrique de la fluorescence du milieu à partir d'un substrat oligopeptidique ayant la Rhodamine comme groupe terminal pouvant être libérée en étant coupée par l'enzyme thrombine. Un substrat de ce type est par exemple décrit dans le document US 4,557,862. Une méthode colorimétrique utilisant un substrat un peu différent, ayant comme chromophore la p-nitroaniline correspond par exemple au produit de Nycomed Pharma commercialisé sous la marque "NYCOTEST-CHROM".

[0012] Ces méthodes colorimétriques présentent l'avantage de ne plus faire appel à des moyens mécaniques ou électromécaniques, mais il est en contrepartie nécessaire d'avoir une étape supplémentaire de centrifugation ou d'ultrafiltration à travers une membrane, comme proposé dans le document EP 0 679 193, pour éliminer les érythrocytes afin d'effectuer la détection seulement sur la partie plasmatique. Ces méthodes ont de plus l'inconvénient d'exiger un appareil de mesure ayant des moyens de détection optique de grande précision, donc un appareil relativement fragile et peu transportable, et de demander un temps de développement de la couleur relativement long, généralement supérieur à 5 minutes, avant de pouvoir effectuer la mesure.

[0013] Une méthode plus simple dans son principe, qui repose sur une mesure électrochimique, est décrite dans le document US 4,304,853. Cette méthode consiste à introduire dans une cellule de mesure comportant au moins deux électrodes, un échantillon de sang citraté et un substrat oligopeptidique qui doit être maintenu dans un milieu solvant tel que le diméthylsulfoxyde (DMSO). Le substrat se compose d'un enchaînement d'acides aminés ayant l'arginine comme acide aminé terminal, lié à un "leaving group" électroactif et dont un hydrogène de l'acide aminé initial peut être remplacé par un groupe protecteur, ces acides aminés, "leaving groups" et groupes protecteurs étant choisis dans des listes très limitatives. En raison de la complexité du phénomène de coagulation due à une cascade de réactions, la présence d'un solvant peut interférer avec les produits intermédiaires conduisant à la libération de thrombine et nuire ainsi à la précision de la mesure.

[0014] Dans une demande de brevet internationale PCT intitulée "Oligopeptidderivate", déposée ce même jour par la société Pentapharm AG (Bâle-Suisse), une sélection particulière des maillons constitutifs du substrat, en particulier des acides aminés et du Leaving group, permet d'effectuer, au moyen d'une cellule de mesure de même nature que précédemment, une détermination d'un temps de coagulation d'un échantillon de sang en milieu liquide, sans qu'il soit nécessaire d'ajouter un solvant ou un co-solvant pour maintenir le substrat en solution. Même si l'utilisation de ces nouveaux substrats présente un avantage certain, l'utilisation d'une cellule de mesure, avec les manipulations que cela nécessite, ne permet pas encore de procurer à un patient, qui voudrait contrôler lui-même son temps de coagulation, un appareil facilement transportable et simple à utiliser.

[0015] Le système selon l'invention a pour but de pallier les inconvénients existant encore dans les systèmes de l'art antérieur en procurant un appareil et des capteurs d'encombrement très réduit grâce à l'utilisation de réactifs spécifiques et d'une méthodologie différente de ce qui était antérieurement utilisé pour la détermination individuelle d'un temps de coagulation.

[0016] A cet effet l'invention a pour objet un système de mesure électrochimique d'une valeur représentative d'un temps de coagulation d'une goutte de sang entier caractérisé en ce qu'il comprend :

- un capteur électrochimique en forme de languette de petites dimensions supportant au moins une électrode de référence et une électrode de travail sur laquelle est immobilisé un réactif spécifique dont la composition incorpore au moins un substrat chimique dont un maillon terminal peut être coupé par l'enzyme thrombine pour donner des groupes chargés (LG), et
- un appareil de mesure dont le circuit électronique, alimenté par une source d'énergie, permettant d'imposer entre

les électrodes du capteur un courant électrique variable ou non ou une différence de potentiel variable ou non, de traiter le signal électrique résultant de la migration des groupes chargés (LG), de corrélérer ledit signal avec une valeur représentative du temps de coagulation et d'afficher ladite valeur sur un écran d'affichage dudit appareil de mesure.

[0017] Le réactif spécifique immobilisé sur l'électrode de travail comprend en outre une thromboplastine et un milieu tampon.

[0018] Le substrat chimique dont un maillon terminal peut être coupé par l'enzyme thrombine pour libérer des groupes chargés LG doit avoir un site stéréospécifique de l'enzyme thrombine. Un substrat chimique approprié est par exemple constitué par un dérivé oligopeptidique et plus particulièrement par un dérivé oligopeptidique ayant pour amino acide terminal l'arginine (arg) liée à un groupe pouvant être coupé par la thrombine pour donner des groupes chargés (LG). Selon un mode de réalisation préféré ces groupes libérables par la thrombine sont choisis parmi les groupes amino-aryl ou amino-hétéroaryl éventuellement substitués, la liaison avec l'arginine s'effectuant par l'une de leurs fonctions amines

[0019] L'invention sera exposée plus en détails en référence aux dessins annexés, dans lesquels :

- la figure 1 représente en perspective un appareil de mesure et un capteur d'un système selon l'invention par la détermination d'un temps de coagulation du sang,
- la figure 2 est un schéma du processus conduisant à un signal électrique exploitable par l'appareil de mesure.
- les figures 3a à 3e représentent des courbes de variation du signal en fonction du rapport PC/PS.
- la figure 4 représente des courbes de variation du signal en fonction du milieu tampon.
- la figure 5 représente des courbes de variation du signal en fonction du mode de séchage.
- la figure 6 représente des courbes montrant la spécificité du substrat.

[0020] A la figure 1 on a représenté, sensiblement à l'échelle 1/1, un appareil de mesure 10, et sensiblement à l'échelle 3/1, un capteur électrochimique 20 en forme d'une languette d'environ 40 mm de long et 8 mm de large.

[0021] L'ensemble formé par l'appareil et un conditionnement de plusieurs capteurs a donc un encombrement comparable à celui de n'importe quel autre appareil portable, ce qui permet à un patient de l'avoir sur lui lors de tous ses déplacements.

[0022] L'appareil de mesure 10 et le capteur électrochimique 20 sont issus d'une même technologie comparable à celle utilisée pour le dosage du taux de glucose, par exemple par une méthode ampérométrique telle que décrite dans les brevets US 5,378,628, US 5,532,602 et EP 0 787 984.

[0023] L'appareil de mesure 10, en tant que tel, comprend un boîtier 11 de forme ovoïde dans l'exemple représenté, construit par assemblage de deux éléments plastiques moulés 11a, 11b, dont l'élément supérieur 11a comporte une fenêtre pour un écran d'affichage 12, et une ouverture pour un bouton de commande 13 permettant d'accéder à différents modes d'affichage.

[0024] Le circuit électronique inclus dans le boîtier est une adaptation des circuits utilisés pour le dosage du glucose, par exemple par ampérométrie comme indiqué précédemment et n'en diffère que par un paramétrage différent du signal électrique afin d'afficher un temps de coagulation.

[0025] L'appareil de mesure 10 comprend également une fente 14, disposée sensiblement entre les deux parties 11a, 11b du boîtier 11, dans laquelle on introduit une portion du capteur 20, qui comporte la zone de contact 28. L'autre portion du capteur 20 comportant une zone de mesure 29 destinée à recevoir un échantillon de sang, restera à l'extérieur de l'appareil 10 pendant tout le temps de la mesure. Dans la plupart des appareils de mesure de l'art antérieur l'échantillon est au contraire introduit à l'intérieur de l'appareil dans une enceinte thermostatée généralement à 37°C, ce qui conduit à une consommation d'énergie supplémentaire.

[0026] Dans le système selon l'invention, dans lequel l'échantillon n'est pas introduit dans une enceinte thermostatée, il est facile de prévoir, si nécessaire, une sonde thermique 15 sur l'appareil à proximité de la fente 14 pour adapter le paramétrage du signal électrique en fonction de la température ambiante, avec une consommation d'énergie bien inférieure à celle nécessaire pour thermostatier une enceinte.

[0027] Le capteur électrochimique 20 représenté à la figure 1 est du type de ceux utilisés pour la détermination du taux de glucose par ampérométrie comme indiqué précédemment. Il comprend un support plastique mince 21, réalisé par exemple en PET, supportant sur toute sa longueur deux collecteurs de courant 24, 25 séparés par un petit espace 23 qui les isole électriquement.

[0028] Le support 21 et les collecteurs 24, 25 sont recouverts d'un revêtement isolant 22 dans lequel sont découpées près de chaque extrémité, par exemple par estampage, deux fenêtres 28, 29 laissant apparaître des portions de collecteurs 24, 25. Une première fenêtre 28 permet de connecter électriquement le capteur 20 à l'appareil de mesure 10, tandis que la deuxième fenêtre 29 constitue la zone de mesure, les portions visibles des collecteurs formant respectivement l'électrode de travail 24a et l'électrode de référence 25a.

[0029] L'électrode de travail 24a est par exemple réalisée par laminage d'une mince bande de platine et l'électrode de référence 25a par laminage d'une mince bande d'argent ultérieurement chlorurée pour former en même temps une électrode de référence. Il est également possible de prévoir de façon séparée dans la zone de mesure 29, une électrode de travail, une électrode de référence et une contre électrode. L'électrode de travail est revêtue d'un réactif spécifique

30 décrit plus en détail ci-après pour permettre la mesure du temps de prothrombine (PT).

[0030] Le réactif spécifique est immobilisé sous une forme sèche à partir d'une composition comprenant dans l'exemple ici décrit au moins une tromboplastine, un milieu tampon et un substrat oligopeptidique ayant une configuration stéréospécifique d'un site de l'enzyme thrombine pour permettre une coupure d'une partie terminale chargée généralement désignée par "leaving group" (LG). Dans les expérimentations rapportées ci-après le substrat utilisé est caractérisé en ce que le le dérivé oligopéptidique ou l'un de ses sels comprend outre l'arginine au moins un autre radical amino-acide choisi parmi l'acide 2-aminobutyrique (Abu), l'alanine (Ala), la 3-cyclohexylalanine (Cha), la 2-cyclohexylglycine (Chg), la phenylalanine (Phe), l'acide pipécolique (Pip), la proline (Pro), la valine (Val), et la glycine (Gly) lesdits amino-acides pouvant être sous forme L, D ou DL.

[0031] Ces oligopeptides et la façon de les obtenir sont décrits plus en détails dans la demande de brevet de la société Pentapharm AG précitée, et dans laquelle le grand intérêt de ces oligopeptides pour la détermination d'un temps de coagulation a été établi de façon expérimentale en milieu liquide au moyen d'une cellule de laboratoire. Il est donc précisé que la présente invention ne concerne pas lesdits oligopeptides en tant que tels, mais les conditions d'optimisation de compositions qui permettent, lorsqu'elles sont déposées sous forme sèche sur un capteur électrochimique, d'obtenir un signal électrique qui soit suffisant pour être traité, qui permette une bonne linéarisation et dont le temps de réponse soit suffisamment court.

[0032] De même le "leaving group" (LG) qui doit, dans les conditions de l'invention, à la fois facilement réagir avec la fonction acide de l'arginine (Arg), pouvoir être coupé par la thrombine et posséder une charge suffisante, est choisi de préférence parmi les dérivés d'aniline, de quinolyamine et de naphtylamine éventuellement substitués par un ou plusieurs substituants choisis parmi un halogène, un radical hydroxy, amino, nitro, alkyl, alkoxy, alkanoyl, anilino, et aminophenyl éventuellement substitué.

[0033] Des expériences ont montré qu'un substrat donné peut permettre de détecter un signal électrique en milieu liquide, tout en étant inopérant ou peu efficace lorsque le même substrat est utilisé sous une forme sèche déposée sur l'électrode de travail d'un capteur électrochimique. Un des facteurs pouvant expliquer cette différence est le fait que l'oligopeptide doit être immobilisé sur l'électrode de travail par l'extrémité de sa chaîne opposée à celle comportant le "leaving group" LG. Ce résultat peut être atteint par le premier amino-acide de la chaîne oligopeptidique, mais de préférence un hydrogène de sa fonction amino terminale est remplacé par un "groupe protecteur" R₁ choisi parmi les acides Boc (terbutoxycarbonyl), Tos (paratoluenesulfonique), t-Bups (ter-butylphenylsulfonyl), Mes (methylsulfonyl), Naps (2-naphtylsulfonyl), Bzo (benzoyl) Z (benzyloxycarbonyl), isopropylsulfonyl, camphosulfonyl.

[0034] Selon un mode de réalisation préféré, on choisit le groupe protecteur, les α -amino-acides et leur enchaînement, ainsi que les "leaving-group" de façon à avoir les substrats oligopeptidiques ci-après :

- Z-Gly-Pro-Arg-3-chloro-4-hydroxyanilide
- Tos-Gly-Pro-Arg-3-chloro-4-hydroxyanilide
- Boc-(D)-Chg-Gly-Arg-3-chloro-4-hydroxyanilide
- H-(D)-Chg-Gly-Arg-3-chloro-4-hydroxyanilide
- Z-Gly-Pro-Arg-2-chloro-4-hydroxyanilide

et leurs sels minéraux ou organiques compatibles.

[0035] Les oligopeptides entrant dans la composition du réactif spécifique sont généralement utilisés sous forme de l'un de leurs sels, formé par exemple avec l'acide chlorhydrique (HCl), l'acide acétique ou l'acide trifluoroacétique (TFA).

[0036] Tous les réactifs permettant de déterminer un temps de coagulation, tel que le temps de prothrombine, contiennent dans leur composition une tromboplastine. Dans les méthodes d'analyses les plus récentes on utilise une tromboplastine reconstituée afin d'éviter les inconvénients des substances extraites de tissus vivants, tels que les risques de contamination et les interférences avec les médicaments ou leurs métabolites véhiculés par le sang. Il s'agit par exemple du produit Innovin® (Dade Int. III. USA), faisant notamment l'objet du brevet EP 0 565 665, dont la composition comprend 25 à 35% d'une phosphatidylsérine (PS) à polarité négative et 65 à 75% d'une phosphatidylcholine (PC) à polarité positive.

[0037] De façon surprenante on a observé que le système selon l'invention permettait d'obtenir une meilleure détermination (hauteur du signal, linéarité) du temps de prothrombine (PT) en utilisant au contraire un facteur tissulaire avec des phospholipides présentant un rapport PS/PC inversé, dans lequel la quantité de phospholipides négatifs est supérieure à la quantité de phospholipides positifs.

[0038] Le réactif spécifique peut incorporer dans sa composition en tant qu'activateur un sel de calcium tel que Ca Cl₂. Toutefois, les conditions d'optimisation obtenues par ailleurs font qu'il n'est pas toujours nécessaire d'incorporer

un sel de calcium étant donné que la concentration en Ca^{++} dans le sang entier est déjà suffisant pour l'activation.

[0039] Comme dans la plupart des réactions biologiques il est nécessaire de maintenir le milieu à un pH déterminé et d'avoir une force ionique suffisante. Parmi tous les milieux tampons bien connus de l'homme de l'art, le tampon Hepes (acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N'-2-aminoethane sulfonique) est celui qui s'est révélé le plus approprié

lorsqu'on utilise des substrats oligopeptides de la société Pentapharm, comme cela sera montré par la suite.

[0040] On observera enfin que l'immobilisation du réactif spécifique sur l'électrode de travail à partir d'une composition liquide ou pâteuse peut être obtenue, sans autres additifs, par les techniques connues de l'homme de l'art. La technique de lyophilisation s'est toutefois révélée comme étant la plus satisfaisante, comme cela sera montré plus loin.

[0041] La figure 2 est une représentation schématique de la réaction chimique qui permet de générer un courant entre les électrodes 24a et 25a qui sont reliées par un circuit électronique de détection non représenté. Le substrat, qui peut être représenté schématiquement par la formule $\text{R}_1\text{-AA}_2\text{-AA}_1\text{-Arg-LG}$ dans laquelle AA_1 et AA_2 représentent d'autres amino-acides tels qu'indiqués précédemment, est lié à l'électrode de travail 24a par le groupe R_1 qui oriente l'oligopeptide, et dont l'autre extrémité de la chaîne comporte un "leaving group" LG tel que défini précédemment. Dans la partie gauche du schéma, on voit que l'enzyme thrombine coupe sélectivement la liaison entre l'arginine et ledit "leaving group" LG. Dans la partie droite du schéma, on voit que le "leaving group" libéré peut migrer vers l'électrode 25a et engendrer un courant qui sera proportionnel au nombre de "leaving group" LG libérés, et donc à la quantité de thrombine formée dans l'échantillon.

[0042] Les expérimentations rapportées ci-après montrent également que les substrats oligopeptides utilisés sont sélectivement coupés par l'enzyme thrombine à l'exclusion de toute autre enzyme présente dans le sang entier.

[0043] Dans les expériences rapportées ci-après on a effectué des mesures potentiostatiques par chronoampérométrie au moyen d'un potentiostat PGP 201 connecté au Software Vm₁ de Radiometer (Copenhague) et permettant d'obtenir les conditions ci-après :

Potentiel 1	0mV	Temps 1	1 sec.
Potentiel 2	300mV	Temps 2	5 min.
Nombre de cycles	1	Fréquence de mesure	1/sec.
Courant minimum	-50mA	Courant maximum	50mA
Sensibilité minimum	1 μ A		

[0044] La surface de l'électrode de travail du capteur utilisé est de 0,035 cm² et la quantité d'échantillon, goutte de sang ou solution de référence, est de 10 μ l. On commence l'enregistrement des mesures 10 secondes après le dépôt de l'échantillon. L'oligopeptide utilisé, ci-après désigné selon l'usage par "substrat", choisi parmi ceux précédemment indiqués, est :

Tos-Gly-Pro-Arg-3-chloro-4-hydroxyanilide, 2HCl.

Expérience 1 : Influence du rapport PC/PS

[0045] On sait que le facteur tissulaire humain reconstitué et activé par une phosphatidylserine (PS) et une phosphatidylcholine (PC) dans une proportion 30/70, active la coagulation dans le plasma en présence de CaCl_2 . Cette composition permet aussi l'activation dans le sang entier, mais la recherche d'une optimisation s'est avérée nécessaire pour obtenir un signal amperométrique suffisamment élevé. Pour cela on a effectué des séries de mesures en faisant varier le rapport PS/PC, comme indiqué ci-après.

[0046] Dans 1000 μ l d'une solution de "tampon TRIS" (triméthylol aminoéthane 50mM, NaCl/100mM, NaN_3 0,02 %) contenant 2,5mg du sel de sodium de l'acide déoxycholique on a dissous 5 μ mol de PC en utilisant un bain à ultrasons pendant 5 minutes pour obtenir une première solution-mère. De même on a préparé une deuxième solution-mère contenant 5 μ mol de PS. On a ensuite mélangé les deux solutions mères pour obtenir une concentration totale en phospholipide (PS + PC) de 2,5 mg par 1000 μ l, après ajustement avec la solution de dilution précitée, de façon à avoir la gamme suivante :

- a - PC 100% - PS 0%
- b - PC 75% - PS 25%
- c - PC 50% - PS 50%
- d - PC 25% - PS 75%
- e - PC 0% - PS 100%

lesdits pourcentages étant exprimés en mol%.

[0047] On a d'autre part mélangé 10 μ l de facteur tissulaire à une concentration de 164mg/ml (Recombinant human

tissue factor de American Diagnostica 4500) avec 20 µl d'eau distillée, puis ajouté 10µl d'une composition PS/PC précédente en complétant jusqu'à 600 µl avec une solution de TRIS contenant du BSA (Bovine Serum Albumine), à raison de 1mg/ml de BSA pour 260 µl, que l'on soumet à agitation pendant 2 minutes. On dilue ensuite 220 µl de cette solution avec solution de TRIS jusqu'à obtenir un volume final de 1100 µl. On répète l'opération précédente avec les

autres compositions PS/PC de façon à avoir une gamme de 5 solutions de tromboplastines différentes.
[0048] Finalement, en utilisant un bain à ultrasons pendant 5 minutes, on dissout dans chacune des solutions précédentes le substrat à une concentration de 0,33mg/ml (0,5mM/l), de façon à obtenir 5 solutions de substrat, c'est-à-dire 5 réactifs spécifiques dans lesquels le rapport PC/PS varie dans les proportions indiquées précédemment.

[0049] Les capteurs électrochimiques soumis à expérience sont enfin préparés en déposant 10µl de réactif spécifique sur l'électrode de travail, puis en effectuant un séchage dans un four à 30° pendant 2h.

[0050] Les figures 3a à 3e sont des courbes représentant la densité de courant exprimée en µA/cm² en fonction du temps exprimé en minutes, les résultats enregistrés pour trois essais différents (3a1, 3a2, 3a3; 3b1, 3b2... etc) en référence à un essai témoin (3a0, 3b0, 3c0, 3d0, 3e0) contenant 10µl de tampon TRIS au lieu de 10µl de sang entier. Comme on le voit à la figure 3a, les courbes 3a0, 3a1, 3a2 et 3a3 sont confondues, c'est-à-dire qu'aucun signal électrique n'est obtenu lorsque le rapport PC/PS est de 100/0. Lorsque le rapport PC/PS est de 75/25, ce qui correspond au rapport préféré de la composition Innovin®, on voit sur la figure 3b que la densité de courant est très faible et se différencie à peine de la courbe témoin 3b0. Lorsque PC et PS sont en égale quantité (Fig. 3c) on obtient une densité de courant significative mais une trop grande dispersion des mesures. Avec un rapport PC/PS de 25/75 on voit à la figure 3d que les courbes 3d1, 3d2, 3d3 sont pratiquement confondues, c'est-à-dire qu'on obtient une bonne reproductibilité des mesures et une linéarité satisfaisante. En utilisant PS seul (Fig. 3e), le signal est plus élevé, mais la reproductibilité peut sembler moins satisfaisante. Ces expériences montrent que la composition préférée doit avoir de 65% à 100% de phosphatidylsérine (PS).

[0051] De plus on observera que les résultats ci-dessus ont été obtenus sans qu'il ait été nécessaire d'ajouter du CaCl₂, étant donné que la concentration en ion calcium dans le sang entier s'est avérée suffisante.

[0052] D'autres expériences ont montré que l'addition de phosphatidyléthanolamine (PE) n'apportait pas d'amélioration aux mesures, et qu'il n'était pas possible d'obtenir une activation uniquement avec le facteur tissulaire, c'est-à-dire sans phospholipides.

Expérience 2 : Influence du milieu tampon

[0053] Selon le même processus que celui décrit pour l'expérience 1, on a préparé une première solution de substrat (d) contenant PC-PS dans le rapport 25/75 avec le tampon TRIS comme milieu tampon, et une deuxième solution de substrat (f) dans laquelle le tampon TRIS est remplacé par le tampon Hepes, puis on a effectué avec chaque solution de substrat, en employant un échantillon de sang d'un même patient deux mesures correspondant respectivement aux courbes 4d1, 4d2 (TRIS) et 4f1, 4f2 (Hepes) de la figure 4. Comme on le voit, on obtient un signal beaucoup plus élevé avec le tampon Hepes, qui peut donc être retenu comme milieu tampon préféré.

Expérience 3 : Influence du mode de séchage

[0054] Dans la présente expérience on a comparé la forme du signal obtenu lorsque le réactif spécifique est séché par lyophilisation avec celui obtenu par séchage au four à 30°C pendant 2h. comme c'était le cas dans les expériences précédentes. Le réactif spécifique est le même que celui de l'exemple 2 avec le tampon Hepes. En employant l'un ou l'autre mode de séchage on effectue chaque fois deux mesures correspondant respectivement aux courbes 5f1, 5f2 (séchage au four) et 5g1, 5g2 (lyophilisation). On peut observer que la technique de lyophilisation permet d'obtenir un signal plus élevé, dans un temps beaucoup plus court. Cela peut être expliqué par le fait que la lyophilisation permet d'obtenir un recouvrement plus homogène de la surface des électrodes que celui obtenu avec un séchage au four.

[0055] D'autres expériences réalisées uniquement avec le substrat en milieu tampon et en utilisant des adjuvants qui permettaient d'optimiser le signal dans le cas d'un capteur de glucose, ont montré que l'utilisation d'une poudre de carbone pour augmenter la surface spécifique n'avait aucun effet favorable, du fait que le courant de base dû à la poudre de carbone interférait avec le courant à mesurer.

Expérience 4 : Spécificité du réactif spécifique vis-à-vis de l'enzyme thrombine

[0056] Etant donné que le sang entier contient de très nombreux composants, la présente expérience permet de montrer que seule l'enzyme thrombine est capable de couper le substrat du réactif spécifique. L'expérience est réalisée dans les conditions d'optimisation définies par l'expérience 3, (à savoir PC/PS dans le rapport 25/75, tampon Hepes et lyophilisation) en partant d'une dilution à parts égales de sang et de solution tampon et en inhibant progressivement l'enzyme thrombine par des concentrations croissantes de r-hirudin (r-hirudin 2000 ATU/ampoule, disponible chez

Pentapharm AG Bâle-Suisse) qui remplacent la solution tampon, en ayant préalablement vérifié que le facteur Xa n'était pas inhibé par la r-hirudin. A la figure 6, la courbe 6a est une courbe de contrôle sans r-hirudin et les courbes 6b à 6g les courbes des mesures effectuées avec respectivement 12,5 ATU/ml; 25ATU/ml; 37,5 ATU/ml; 50 ATU/ml; 100 ATU/ml; 1000 ATU/ml.

[0057] Comme on le voit la hauteur du signal diminue au fur et à mesure que la concentration en r-hirudin augmente jusqu'à devenir pratiquement nul à partir de 100 ATU/ml. On peut donc en conclure que le système selon l'invention permet au substrat d'être sélectivement coupé par la thrombine, et donc de permettre une détermination sélective de cette enzyme.

[0058] Comme on le voit en se référant plus particulièrement aux courbes 6a, 6b et 6c, la valeur maximum est sensiblement proportionnelle à la diminution de l'enzyme thrombine dans l'échantillon, ce qui permet d'envisager un paramétrage linéaire. Dans la pratique, on ne prend pas la valeur maximum, mais la valeur correspondant au point d'inflexion de la partie ascendante de la courbe, c'est-à-dire le point pour lequel la vitesse de libération de la thrombine est maximum. Dans la pratique on utilise des fenêtres de détection de 15 secondes et on retient la valeur comprise entre deux fenêtres de détection pour lesquelles on observe le passage d'une augmentation du sens de la pente à une diminution du sens de la pente.

Revendications

1. Système de mesure électrochimique d'une valeur représentative d'un temps de coagulation d'une goutte de sang entier, caractérisé en ce qu'il comprend :

- un capteur électrochimique en forme de languette de petites dimensions supportant au moins une électrode référence et une électrode de travail sur laquelle est immobilisé un réactif spécifique dont la composition incorpore au moins un substrat chimique dont un maillon terminal peut être coupé par l'enzyme thrombine pour donner des groupes chargés (LG), et
- un appareil de mesure destiné à recevoir le capteur et dont le circuit électronique, alimenté par une source d'énergie, permet d'imposer entre les électrodes du capteur un courant électrique variable ou non ou une différence de potentiel variable ou non, de traiter le signal électrique résultant de la migration des groupes chargés (LG), de corrélérer ledit signal avec une valeur représentative du temps de coagulation et d'afficher ladite valeur sur un écran d'affichage dudit appareil de mesure.

2. Système de mesure selon la revendication 1, caractérisé en ce que le substrat chimique du réactif spécifique est un dérivé oligopeptidique.

3. Système de mesure selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que le réactif spécifique comprend en outre une thromboplastine et un milieu tampon.

4. Système de mesure selon la revendication 2, caractérisé en ce que le dérivé oligopeptidique a pour amino-acide terminal l'arginine (Arg) liée à une fonction amine d'un groupe amino-aryl ou amino-hétéroaryl éventuellement substitué, ledit groupe pouvant être coupé par la thrombine pour donner les groupes chargés (LG).

5. Système de mesure selon la revendication 4, caractérisé en ce que le dérivé oligopéptidique ou l'un de ses sels comprend outre l'arginine au moins un autre radical amino-acide choisi parmi l'acide 2-aminobutyrique (Abu), l'alanine (Ala), la 3-cyclohexylalanine (Cha), la 2-cyclohexylglycine (Chg), la phenylalanine (Phe), l'acide pipécolique (Pip), la proline (Pro), la valine (Val) et la glycine (Gly), lesdits amino-acides pouvant être sous forme L, D ou DL.

6. Système de mesure selon la revendication 4, caractérisé en ce que le groupe amino-aryl ou amino-hétéroaryl (LG) du substrat oligopeptidique est choisi parmi les dérivés d'aniline, de quinolylamine et de naphthylamine éventuellement substitués par un ou plusieurs substituants choisis parmi un halogène, un radical hydroxy, amino, nitro, alkyl, alkoxy, alkanoyl, anilino et aminophényl éventuellement substitué.

7. Système de mesure selon l'une quelconque des revendications 4 à 6, caractérisé en ce que le premier amino-acide du substrat oligopeptidique a en outre un hydrogène de sa fonction amino remplacé par un groupe protecteur choisi parmi les acides Boc (ter-butoxycarbonyl), Tos (para-toluenesulfonique), t-Bups (ter-butylphenylsulfonyl), Mes (methylsulfonyl), Naps (2-naphthylsulfonyl), Bzo (benzoyl) Z (benzyloxycarbonyl), isopropylsulfonyl, campho-sulfonyl.

8. Système de mesure selon l'une quelconque des revendications 4 à 7, caractérisé en ce que le substrat oligopeptidique est choisi parmi :
- Z-Gly-Pro-Arg-3-chloro-4-hydroxyanilide
 - Tos-Gly-Pro-Arg-3-chloro-4-hydroxyanilide
 - Boc-(D)-Chg-Gly-Arg-3-chloro-4-hydroxyanilide
 - H-(D)-Chg-Gly-Arg-3-chloro-4-hydroxyanilide
 - Z-Gly-Pro-Arg-2-chloro-4-hydroxyanilide
- et leurs sels minéraux ou organiques compatibles.
9. Système de mesure selon la revendication 8, caractérisé en ce que le sel du substrat oligopéptidique est formé avec l'acide chlorhydrique (HCl), l'acide acétique ou avec l'acide trifluoroacétique (TFA).
10. Système de mesure selon la revendication 3, caractérisé en ce que la tromboplastine du réactif spécifique déposé sur l'électrode de travail du capteur électrochimique comprend une composition dans laquelle la quantité de phospholipides négatifs est supérieure à la quantité de phospholipides positifs.
11. Système de mesure selon la revendication 10, caractérisé en ce que le taux de phospholipides négatifs, tel que la phosphatidylsérine (PS), est supérieur à 65%.
12. Capteur électrochimique pour la détermination du temps de prothrombine (PT) du sang entier comprenant :
- un support mince isolant en forme de languette
 - au moins deux conducteurs de courant électriquement isolés et disposés sur ladite languette
 - un revêtement isolant recouvrant lesdits conducteurs et délimitant à une extrémité une zone de contact pour un raccordement avec les bornes d'un appareil électronique de mesure, et près de l'autre extrémité une fenêtre laissant apparaître des portions de conducteurs formant respectivement une électrode de référence et une électrode de travail
 - un réactif spécifique du temps de prothrombine disposé sur l'électrode de travail
- caractérisé en ce que ledit réactif spécifique est sous une forme sèche et qu'il comprend dans sa composition un substrat oligopéptidique selon les revendications 1 à 9, une tromboplastine, et un milieu tampon.
13. Capteur selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que le réactif spécifique comprend en outre dans sa composition un sel de calcium tel que CaCl_2 .
14. Capteur selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que le tampon est le tampon HEPES.
15. Capteur selon la revendication 12, caractérisé en ce que le réactif spécifique est d'abord préparé sous une forme liquide ou pâteuse, appliqué sur l'électrode de travail par pipetage ou sérigraphie, puis amené à l'état sec par lyophilisation.
16. Appareil de mesure électronique pour la détermination du temps de prothrombine (PT) d'un goutte de sang entier déposé sur une zone de mesure d'un capteur connecté audit appareil comprenant :
- un boîtier logeant une source d'énergie et permettant de connecter un capteur selon une des revendications 9 à 12
 - un circuit électronique permettant de moduler une tension ou une intensité entre les électrodes dudit capteur, d'interpréter un signal représentatif du temps de prothrombine, et de l'afficher sur un écran, caractérisé en ce que la miniaturisation des composants et en particulier du circuit électronique permet d'en réduire les dimensions pour avoir un appareil portable.
17. Appareil de mesure selon la revendication 16, caractérisé en ce que la source d'énergie est une source d'énergie autonome telle qu'une pile ou un accumulateur.
18. Appareil de mesure selon la revendication 16, caractérisé en qu'il comporte en outre des moyens pour amener et

maintenir à une température déterminée la zone de mesure.

19. Méthode de détermination amperométrique du temps de prothrombine d'une goutte de sang entier déposée dans la zone de mesure d'un capteur électrochimique selon la revendication 12 introduit dans un appareil de mesure électronique, caractérisé en ce que le circuit électronique dudit appareil de mesure permet de

- détecter la présence d'une goutte de sang pour établir entre les électrodes une tension déterminée;
- enregistrer une courbe donnant la variation du courant en fonction du temps;
- déterminer au moyen de fenêtres de mesure le point d'inflexion de ladite courbe qui correspond à la vitesse maximale de libération de la thrombine;
- corrélér, par exemple au moyen d'une table d'étalonnage, les coordonnées dudit point avec une valeur de temps de prothrombine (PT), et
- afficher ladite valeur sur un écran d'affichage.

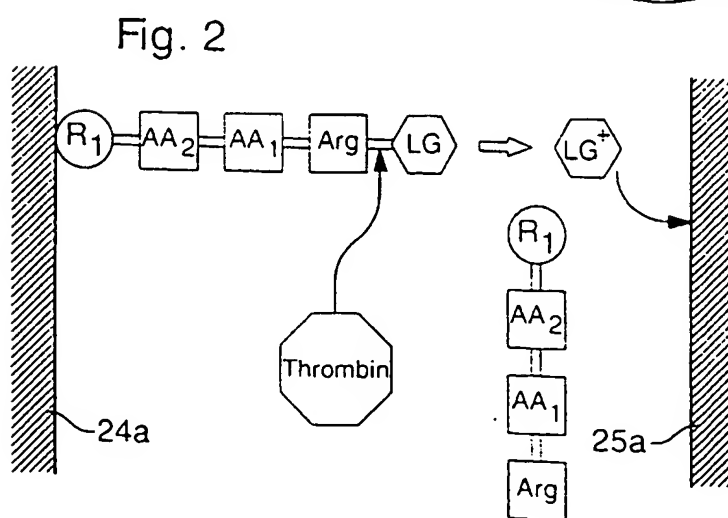
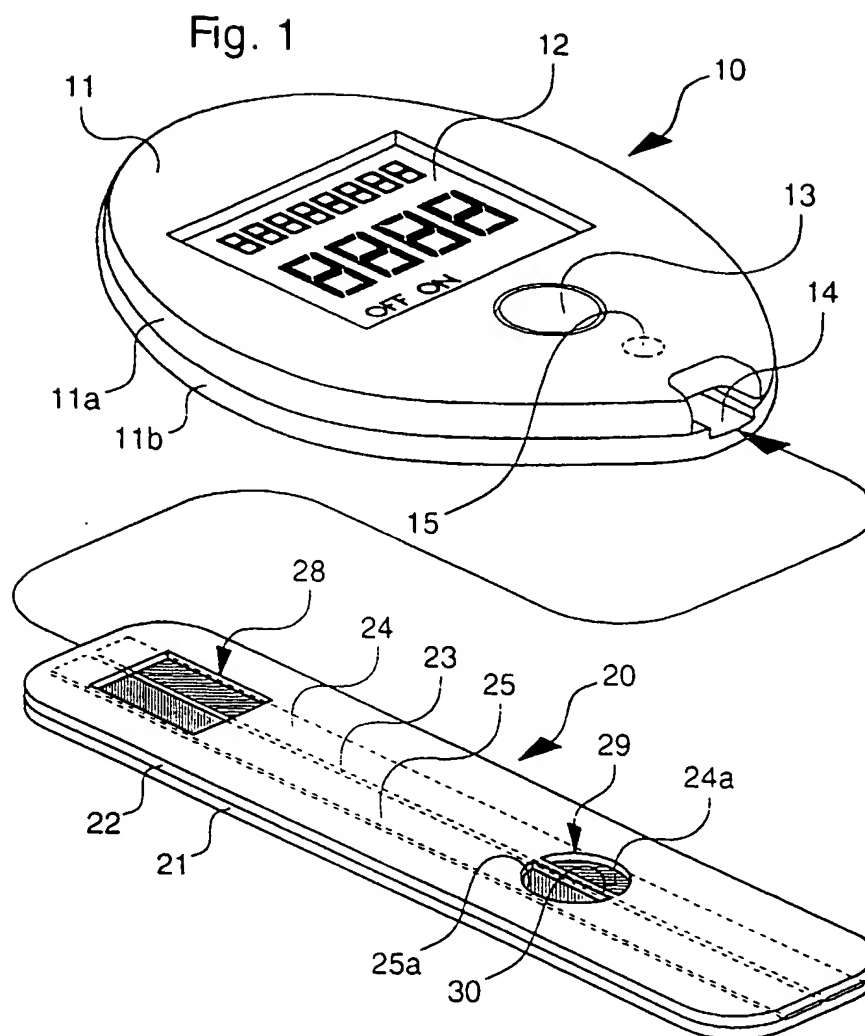


Fig. 3a

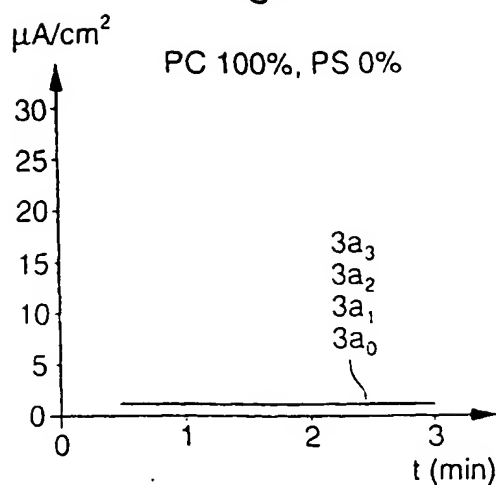


Fig. 3b

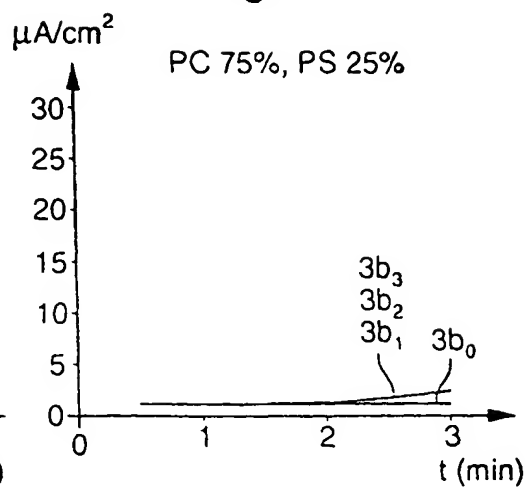


Fig. 3c

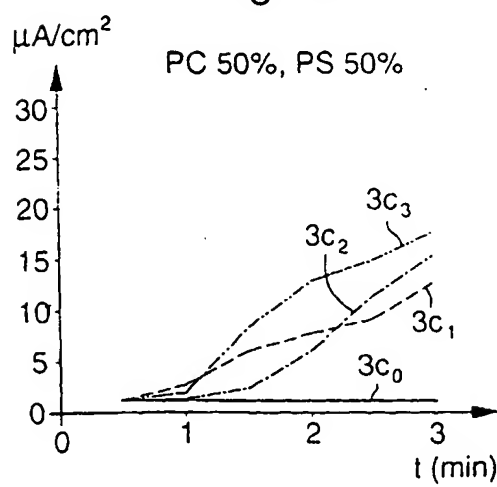


Fig. 3d

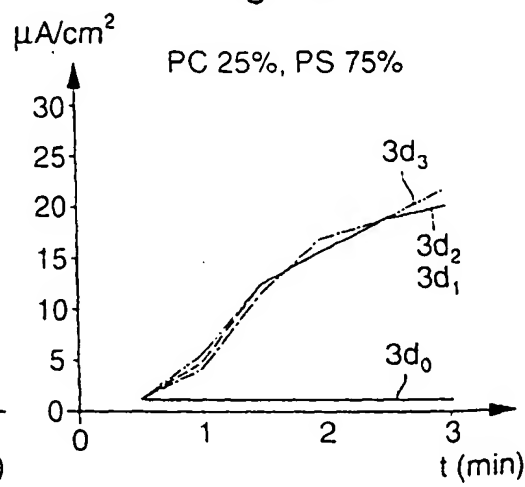
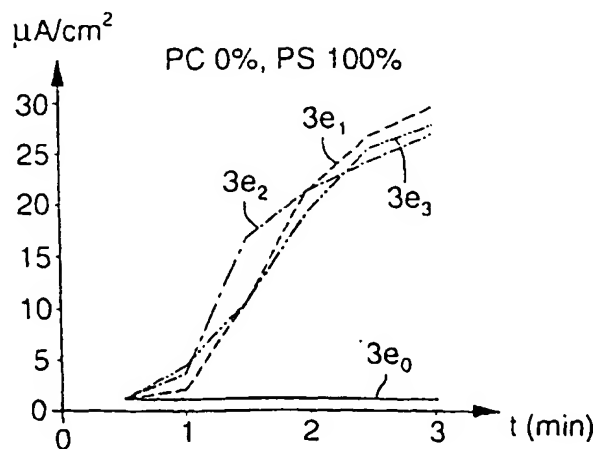
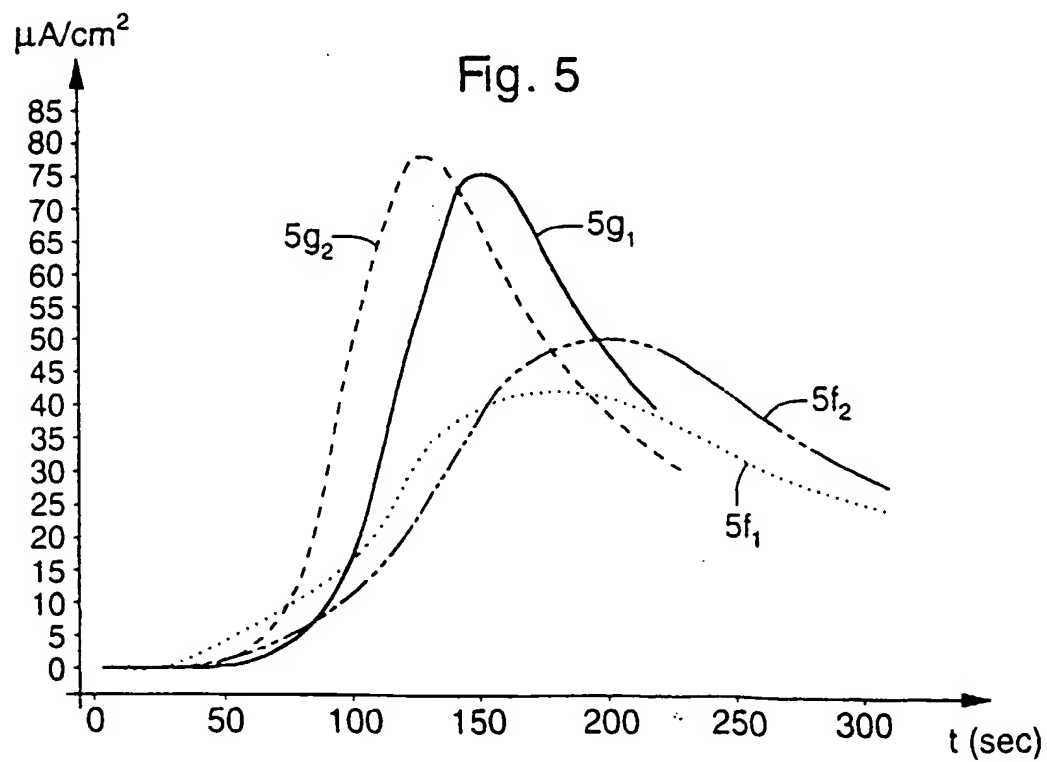
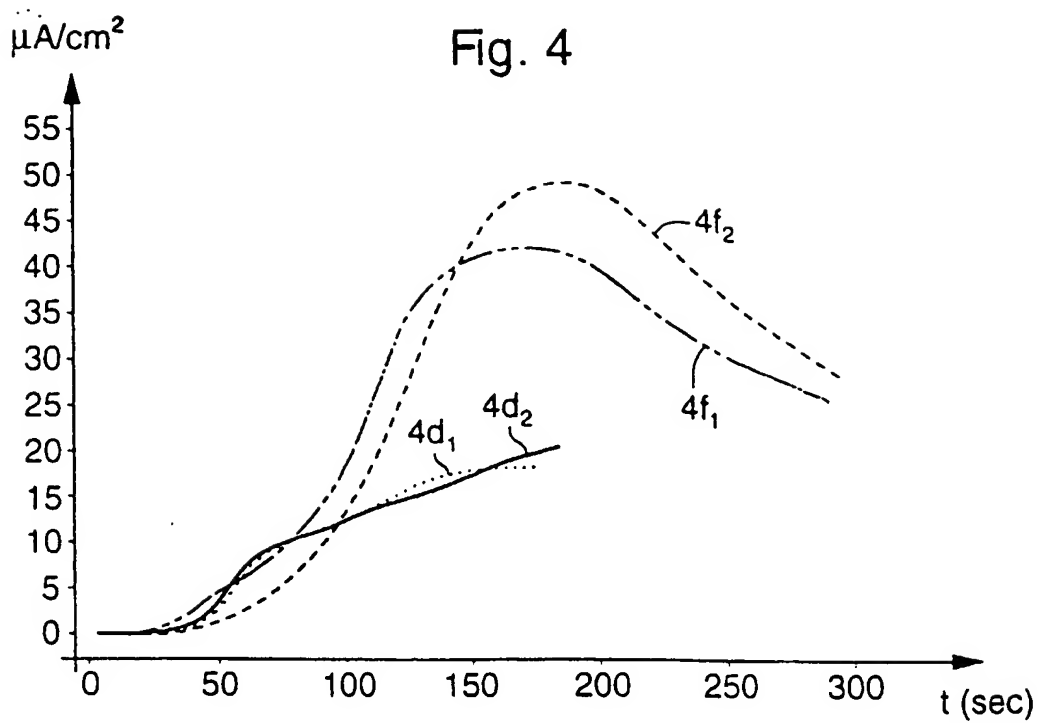
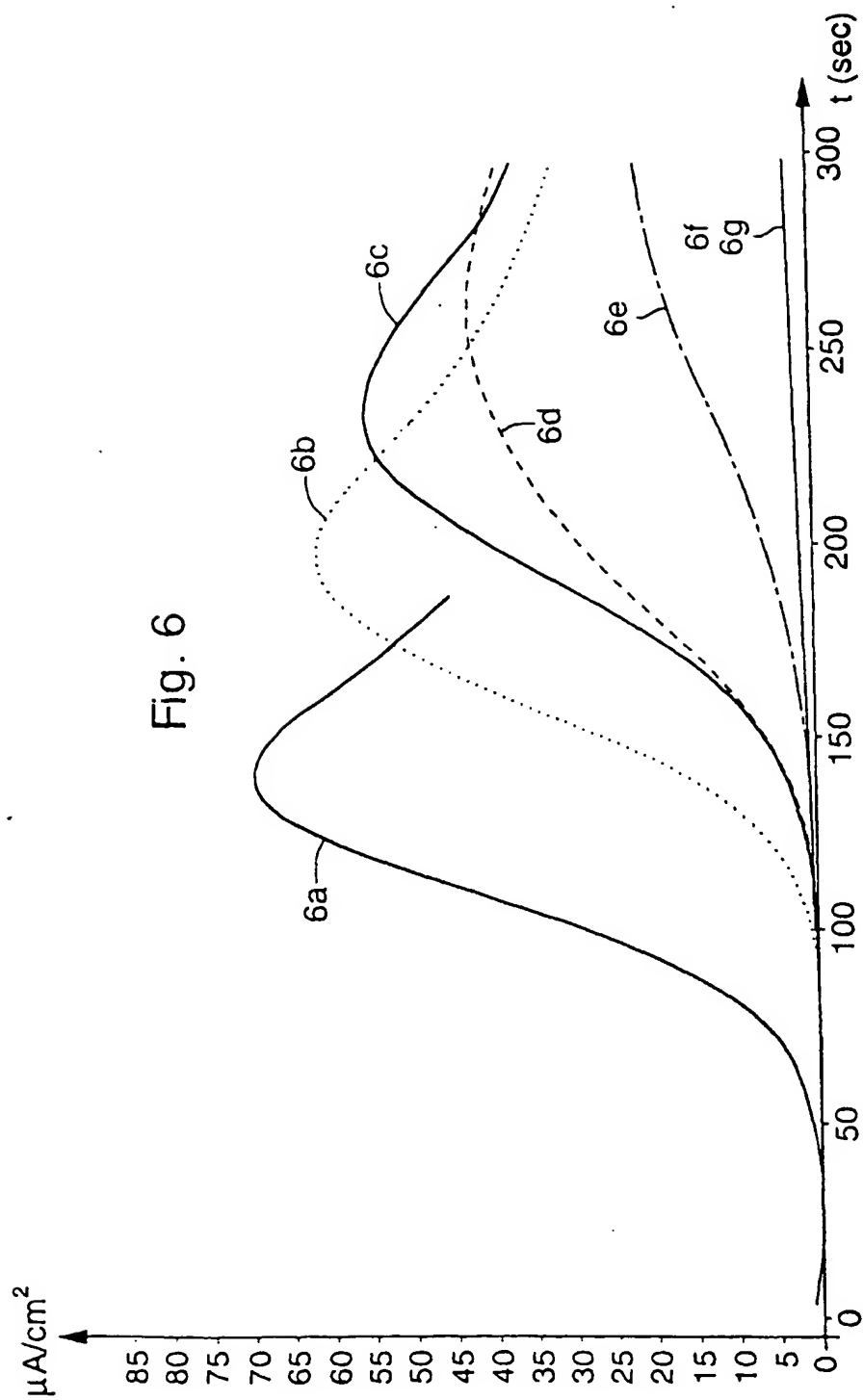


Fig. 3e









Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numéro de la demande

EP 99 10 3418

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.Cl.6)
A	EP 0 737 853 A (BEHRINGWERKE AG) 16 octobre 1996 * le document en entier * ---	1	G01N27/327 C1201/00 C1201/56
A	WO 94 16095 A (AVOCET MEDICAL INC) 21 juillet 1994 * exemples * ---	1	
A	US 5 418 141 A (ZWEIG STEPHEN E ET AL) 23 mai 1995 * abrégé * ---	1	
D,A	US 4 304 853 A (JOZEFONVICZ MARCEL ET AL) 8 décembre 1981 * abrégé * -----	1	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.6)
			C120 G01N
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 7 juillet 1999	Examineur Moreno, C
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			

EPO FORM 1503 03 82 (P4/C02)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET EUROPEEN NO.**

EP 99 10 3418

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche européenne visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

07-07-1999

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0737853 A	16-10-1996	DE 19512710 A	17-10-1996
		AU 5054196 A	24-10-1996
		CA 2173706 A	11-10-1996
		JP 8285756 A	01-11-1996
		US 5892144 A	06-04-1999
WO 9416095 A	21-07-1994	US 5344754 A	06-09-1994
		AU 5994194 A	15-08-1994
		CA 2152498 A	21-07-1994
		EP 0679193 A	02-11-1995
		JP 8508094 T	27-08-1996
		US 5554531 A	10-09-1996
US 5418141 A	23-05-1995	AU 689260 B	26-03-1998
		AU 2469995 A	29-11-1995
		CA 2188437 A	16-11-1995
		EP 0758401 A	19-02-1997
		JP 10500008 T	06-01-1998
		WO 9530770 A	16-11-1995
US 4304853 A	08-12-1981	FR 2455083 A	21-11-1980
		FR 2471410 A	19-06-1981
		CA 1149019 A	28-06-1983
		EP 0018002 A	29-10-1980
		JP 1261556 C	25-04-1985
		JP 55144899 A	12-11-1980
		JP 59035598 B	29-08-1984

EPO FORM P0480

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82